

Сравнительный анализ аминокислотных замен в генах ОТ и протеазы исследуемого штамма ВИЧ с имеющимися данными литературы о мутациях, ассоциированных с резистентностью к антиретровирусным препаратам [3] позволяет сделать заключение о лекарственной устойчивости исследованного клинического изолята (табл.3).

Таблица 3

Аминокислотные замены в генах обратной транскриптазы и протеазы, ассоциированные с устойчивостью к антиретровирусным препаратам, обнаруженные в клиническом изоляте ВИЧ

Ген	Аминокислотная замена/комбинация замен	Лекарственная устойчивость к препарату/комбинации препаратов	
		Абсолютная	Умеренная
ОТ	K65R	Tenofovir	Didanosine, Abacavir, Lamivudine/Emtricitabine
Протеазы	L10I+I13V+M36I+H69K		Tipranavir/Ritonavir

Проведенные молекулярно-генетические исследования показали, что в генах ОТ и протеазы клинического изолята ВИЧ от пациента Б. присутствуют 170 мутаций. Однако, вследствие вырожденности генетического кода, количество значимых мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка оказалось почти в 4 раза меньше: 33 в гене ОТ и 13 в гене протеазы.

Сравнение полученных аминокислотных последовательностей исследованного штамма ВИЧ с данными литературы о мутациях, ассоциированных с резистентностью ВИЧ к антиретровирусным препаратам позволило сделать вывод о нецелесообразности включения в схему АРТ пациента Б. следующих препаратов: Tenofovir, Didanosine, Abacavir, Lamivudine, Emtricitabine, Tipranavir, Ritonavir.

#### Выводы

1. В генах протеазы и обратной транскриптазы штамма ВИЧ от инфицированного пациента Б. выявлено большое количество мутаций (170), что свидетельствует о высокой изменчивости вируса.

2. Обнаружено 46 мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в белках ОТ и протеазы.

3. Пять из выявленных аминокислотных замен определяют устойчивость исследованного штамма ВИЧ к антиретровирусным препаратам: одна замена в гене ОТ (K65R) ассоциирована с абсолютной устойчивостью к препарату Tenofovir и умеренной устойчивостью к комбинации Lamivudine/Emtricitabine, а также препаратам Didanosine и Abacavir. Сочетание четырех мутаций в гене протеазы (L10I+I13V+M36I+H69K) является маркером умеренной устойчивости изолята к комбинации препаратов Tipranavir / Ritonavir.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление мутаций в геноме ВИЧ-1, связанных с резистентностью к антиретровирусным препаратам, при лечении ВИЧ-инфекции у детей// Г. И. Коровина, Ю. А. Фомин, М. В. Галкина, Е. Е. Воронин, Ф. Е. Райзе, И. М. Улюкин //Terra Medica Nova: Всероссийский журнал для врачей всех специальностей [http://www.terramedica.spb.ru/1\\_2002/korovina.htm](http://www.terramedica.spb.ru/1_2002/korovina.htm)
2. Оптимизация схем лечения ВИЧ-инфекции с учетом данных по лекарственной устойчивости ВИЧ/ Г. И. Коровина, Ю. А. Фомин, К. Н. Додонов, Е. Е. Воронин, Ф. Е. Райзе, И. М. Улюкин, А. Н. Ясинская//Terra Medica Nova: Всероссийский журнал для врачей всех специальностей [http://www.terramedica.spb.ru/ld2\\_2003/korovina.htm](http://www.terramedica.spb.ru/ld2_2003/korovina.htm)
3. HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms// <http://www.hivfrenchresistance.org/2009/Algo-2009.pdf>

#### СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Зубанов П.С., Зверева А.Е., Васильева М. С., Улыбин А.И., Медведева С.Ю.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Макеев О.Г.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Росздрава  
ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Одним из наиболее перспективных исследовательских направлений в области клеточных технологий считается изучение мезенхимальных клеток-предшественников – клеточной популяции, которая присутствует в организме взрослого человека и способна давать начало всем клеткам, составляющим основу соединительной, хрящевой, костной, жировой и мышечной тканей. Также в литературе имеются сведения, указывающие на причастность мезенхимальных стволовых клеток к формированию кровеносных сосудов, нервной и глиальной тканей [3].

В настоящее время минимальные критерии, которые необходимы для идентификации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в культуре, определены международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy) в 2006 году [5]. К основным характеристикам ММСК отнесены, во-первых, адгезивные свойства, то есть способность самостоятельно прикрепляться к специальному пластику в культуральных условиях; во-вторых, экспрессия трёх типов маркёров: CD73, CD90 и CD105. Дополнительно может проводиться негативный сортинг антигенов: CD14, CD19 (или CD79а), CD34 и CD45. В-третьих, подтверждение возможности дифференцировки минимум в трёх ортодоксальных направлениях: хондрогенном, остеогенном и адипогенном [4].

Согласно современным представлениям, для достоверной идентификации ММСК, следует подтвердить позитивность по всем трём группам критериев. Использование, например, только антигенной характеристики путём анализа CD-маркеров не обеспечивает получения достоверных результатов [6].

#### **Цель исследования**

Идентификация культур фибробластоподобных клеток, выделяемых из жировой ткани передней брюшной стенки человека, по критериям принадлежности к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам.

#### **Материалы и методы**

Использовали ММСК, полученные из жировой ткани передней брюшной стенки человека при липосакции аппаратным способом. Выделение ММСК проводили механо-ферментативным методом, используя в качестве диспергента коллагеназу. Жировую ткань смешивали с коллагеназой в пропорции 1:2 по объему и инкубировали при температуре 37°C при постоянном перемешивании, в течение 2 часов. После ферментации взвесь клеток пропускали через нейлоновый фильтр с величиной пор 100 мкм и дважды отмывали от раствора диспергента питательной средой.

Жизнеспособность полученных клеток оценивали по результатам окрашивания трепановым синим.

С целью наращивания клеточной массы ММСК культивировали с использованием культуральной среды DMEM (Sigma-Aldrich) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hy-clone). При культивировании клеток использовали авторские методики [2].

Для оценки экспрессии специфических позитивных и негативных маркеров применяли методы флуоресцентной микроскопии (качественный анализ) и проточной цитофлуориметрии (количественный анализ). Требования к экспрессии рецепторов на поверхности исследуемых клеток: для CD73, CD90 CD105 – не менее 95% клеток в образце, для CD31, CD1, CD14 – не более 2% клеток.

С целью оценки полипотентности клеток использовали специальные среды, содержащие факторы роста и дифференцировки в хондрогенном и остеогенном направлениях. Также для подтверждения дифференцировки культур анализировали биохимические маркеры (щелочная фосфатаза, коллаген I типа, остеоонтин, остеоонектин, остеокальцин, костный синалопротеин, коллаген II и IV типа, сульфатированные протеогликаны, а также ряд мембранных поверхностных маркеров, определяемых иммунофлуоресцентными методами: RunX-1, BMP-2, BMP-4, PTH-рецептор).

Для морфологической оценки полученные культуры использовали гистологические методы окрашивания препарата.

Результаты обрабатывали в программном пакете Statistica.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Клетки, полученные из жира передней брюшной стенки человека, проявляли высокую способность к адгезии на культуральном пластике. Ещё на этапе выделения свойство адгезии использовалось как своеобразный метод сортировки: только те клетки, которые смогли закрепиться на пластике в течение первых суток культивирования, сохранялись в культуре, остальные были удалены при первом или последующих пассажах.

Адгезировавшие клетки имели веретенообразную или отростчатую (фибробластоподобную) форму. При пролиферации клетки демонстрировали способность к локомоции по культуральной поверхности, постепенно распространяясь максимально возможную площадь с утратой контакта между собой.

При приближении культуры к состоянию монослоя пролиферация клеток заметно замедлялась, а затем останавливалась. Тем самым, культура демонстрировала способность к контактному торможению, которое относится к одному из проявлений чувства собственного пула. Данная характеристика типична для всех клеток, полностью или частично отличающихся свойствами «стволовости» и/или реализующих восстановление клеточной популяции.

Снятие клеточной культуры с поверхности методом трипсинизации сопровождалось изменением формы клеток с отростчатой на шарообразную, что связано с клеточной адгезией. Трипсин, разрушая поверхностные адгезивные белки, лишал клетку основы фиксации на поверхности, после чего клетка приобретала шарообразную форму и смывалась с поверхности культурального пластика.

После нейтрализации трипсина и перенесения снятой культуры на новую поверхность, уже через 30-40 минут клетки прочно закреплялись на пластике, переставали поддаваться обычному механическому смыванию и постепенно приобретали отростчатую форму.

Таким образом, можно заключить, что фиксация клеток на культуральном пластике и их отростчатая форма указывает на способность к адгезии – одному из основных отличительных свойств ММСК, а эффект трипсинизации – на механизм адгезии, реализуемый за счет трипсин-лабильных поверхностных белков.

Второй необходимый критерий идентификации ММСК – экспрессия набора определённых поверхностных маркеров. В соответствии с принятыми критериями ММСК должны экспрессировать маркеры CD73, CD90, CD105 и отличаться минимальной экспрессией CD34, CD45, CD14, CD19 (и некоторых других негативных маркеров).

Метод флуоресцентной микроскопии клеток, выделенных из жира передней брюшной стенки, продемонстрировал экспрессию необходимого набора позитивных маркеров (CD73, CD90, CD105). Несмотря на то, что методика не относится к количественным, а оставляет возможность лишь для качественного определения, однако интенсивность флуоресценции позволяла предположить достаточно сильную экспрессию изучаемых маркеров.

Флуоресцентная микроскопия по определению CD14, CD34 и CD45 фактически не позволила идентифицировать флуоресценцию цветов, соответствующих использованным флуорохромам, что свидетельствует о крайне низком уровне экспрессии негативных маркеров.

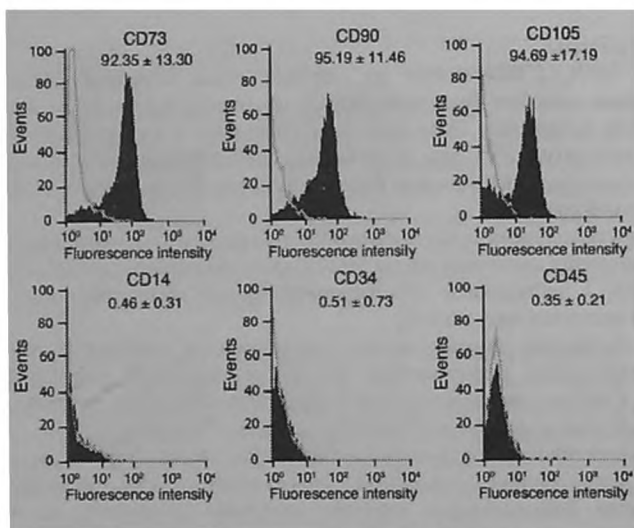


Рис. 1. Количественный анализ CD-маркеров

Количественный анализ маркеров с применением метода проточной цитофлуориметрии показал однонаправленные результаты с данными флуоресцентной микроскопии. Средний уровень экспрессии маркеров CD73, CD90 и CD105 был выше, чем 90% (от 92.35 до 95.19). По-видимому, исследуемая культура ММСК содержит незначительную часть клеток, не экспрессирующих позитивные маркеры. Однако, доля этих клеток количественно не превышает 4-7%, что позволяет считать, что большая часть клеток в исследуемых образцах принадлежит к ММСК и параметры культуры в целом соответствуют свойствам ММСК.

В пользу означенного свидетельствует экспрессия негативных маркеров CD34, CD45 и CD14, при анализе которых не выявлено отличий от показателей отрицательного контроля (менее 1%). Этот показатель в полной мере соответствует требованиям для чистых культур ММСК (экспрессия негативных маркеров не более 2%) (рис. 1).

Стандартный анализ сигналов, полученных от неповрежденных клеток методом рассеяния лазерного пучка, продемонстрировал содержание в образце не менее 95% неповреждённых клеток, что достаточно для верификации результатов как достоверных.

Третьим необходимым критерием идентификации ММСК является способность к дифференцировке в трёх направлениях: остеогенном, хондрогенном и адипогенном.

Для хондрогенной дифференцировки культура ММСК пересевалась со средней плотностью на культуральную поверхность. После «закрепления» на поверхности (в течение 2-х суток) стандартная среда менялась на специальную хондрогенную, после чего клетки культивировали в течение 10 суток.

Уже на 4-е сутки культивирования в среде стали заметны изменения морфологии клеток. Отростчатая и веретенообразная (фибробластоподобная) форма изменилась на более округлую, а также увеличилось ядерно-цитоплазматическое соотношение (это, как правило, свидетельствует об усилении синтетической активности). Было отмечено, что клетки практически утратили подвижность, а среднее расстояние между клетками снизилось.

На 5-е сутки наблюдалось выраженное увеличение массы межклеточного вещества. При фиксации полученной культуры последняя приобретала вид насыщенно белого налёта. При обработке трипсином клетки послойно отсоединялись от пластика, оставаясь прочно сцепленными между собой в виде монослоя. Это наблюдение объясняется появлением большой массы межклеточного вещества, которое сохраняет прочные

контакты после короткой обработки трипсином, что характерно для хрящевой ткани. Для достоверного определения дифференцировки клеток использовались гистологические красители.

Окраска по Вейнгерт Ван Гизону позволила определить, что межклеточный матрикс содержит большое количество коллагена. Следует отметить, что матрикс при этом не имел выраженной фибриллярной структуры, на препаратах он проявлялся в виде полей малинового цвета (разной степени насыщенности в зависимости от степени зрелости коллагена). Также на препаратах определялись эластические волокна светло-коричневого цвета, которые сопровождали коллагеновые структуры. Нефибриллярные массы коллагена, наличие небольшого количества эластических волокон, большой объём межклеточного вещества позволяет охарактеризовать формирующуюся хрящевую ткань.

Окраска ализариновым синим (при pH 2.5) позволила выявить ещё один признак межклеточного матрикса, характерного для хрящевой ткани – наличие кислых мукополисахаридов. На окрашенных препаратах они представлены в виде гомогенных полей с различными оттенками голубого. Отмечается отсутствие выраженной фибриллярности в строении матрикса.

Интересные данные были получены с использованием окраски по Маллори. На этих препаратах выявлены выраженные коллагеновые структуры в межклеточном матриксе. При этом наблюдались участки с фибриллярностью строения.

На некоторых участках препарата коллаген (окрашенный в синий цвет) присутствовал в виде отдельных фрагментов, а основной объём занимали сами клетки (видны по ядрам, окрашенным в малиновый цвет). На других участках культура имела признаки зрелой хрящевой ткани: большое количество коллагена, покрашенного в синий цвет; разреженность клеток; выраженные поля плотного межклеточного матрикса с перемежающимися группами – относятся к характерным морфологическим признакам хондрогенной дифференцировки.

Иммуногистохимическое исследование позволило подтвердить результаты, полученные с помощью гистологических методик. На препаратах в межклеточном матриксе выявлен коллаген 2 типа (окрашен в коричневый цвет) в большом количестве.

Таким образом, выявление в различно окрашенных препаратах структурных компонентов хрящевой ткани, а также ее специфические признаки, убедительно доказывают факт дифференцировки ММСК в хондрогенном направлении.

Другое направление дифференцировки ММСК (из тех направлений, которые необходимы для идентификации культуры) - остеогенное.

После замены обычной культуральной среды на среду с остеогенными потенциями, видимые морфологические изменения культуры наблюдались к 6-м суткам. Эти изменения имеют общие черты с процессом хондрогенной дифференцировки и связаны с синтезом большого количества межклеточного вещества. Монослой клеток также обретал плотность, плохо ресуспендировался при обработке трипсином. Однако эти признаки были выражены в меньшей степени, чем у культуры с хондрогенной дифференцировкой (меньший объём и меньшая степень плотности межклеточного матрикса). Клетки при этом не подвергались округлению, сохраняли отростчатую форму, а отростки становились более выраженными. Клетки сохраняли способность к движению по культуральной поверхности, перемешались друг от друга, оставляя расстояние между собой.

Морфологические свойства полученной культуры хотя и напоминали культуру, полученную в ходе хондрогенной дифференцировки, имели при этом существенные отличия, свидетельствующие о том, что в данном случае мы получили другой дифферон. Отличия хорошо видны на препарате, окрашенном по Маллори, на котором коллагеновые волокна присутствуют в матриксе, но при этом составляют не основную его часть, а имеют гораздо более выраженную фибриллярную структуру. Отмечается менее плотное расположение клеток.

Для идентификации остеогенного направления дифференцировки использовался метод окраски Ализарином красным. Этот метод считается наиболее высокоспецифичным по отношению к костной ткани, и рассматривается в качестве метода, применяемого для идентификации остеогенного направления дифференцировки ММСК. Анализ препарата позволил выявить высокоспецифические свойства костной ткани.

Таким образом, факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистологически.

Третье направление дифференцировки клеток, применяемое в качестве доказательства принадлежности культуры к ММСК – адипогенное. Дифференцировка в этом направлении осуществлялась спонтанно, при культивировании в стандартной среде более 6 недель. В культуре появлялись одиночные адипоцитоподобные клетки, хорошо различимые при фазово-контрастной микроскопии. Адипоцитоподобные клетки имели близкую к сферической форму, сильно вакуолизированную цитоплазму, содержащую липидные включения [1] Принадлежность включений к липидам установлена посредством окрашивания содержимого вакуолей красителем Судан III.

Таким образом проведенными исследованиями установлена способность полученной культуры клеток к адгезии на поверхности культурального пластика; экспрессия трех позитивных (CD73, CD90, CD105) и трех негативных маркеров, доказана возможность дифференцировки в ортодоксальных направлениях (хондрогенном, остеогенном, адипогенном), что позволяет идентифицировать исследуемые клеточные культуры в качестве культур ММСК.

## Выводы

1. Проведенные исследования позволили идентифицировать клетки, получаемые из жировой ткани человека, как ММСК согласно международным критериям.
2. Метод получения ММСК создает основу не только для продолжения изучения их свойств, но и для разработки новых технологий применения ММСК с целью заместительной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Жамбалова А.П., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б., Гальчук С.В., Романов Ю.А.. Влияние пониженного содержания кислорода на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro* //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2009. - Т. III. - № 3. - с. 47-51.
2. Makeev O.G., Ulybin A.I., Zubanov P.S. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи» //Бюллетень изобретений №4, 10.02.2009.
3. Репин В.С., Сабурин И.Н.. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2006. - № 3(5). - с. 64-72.
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J. and Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. - 2006. – vol. 4. - p. 315-317.
5. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A.; the International Society for Cellular Therapy. Classification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. - 2005. – vol. 7 (5). - p. 393-5.
6. Sabatini F., Petecchia L., Taviani M., et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities //Lab Invest. - 2005. - vol. 85. - p. 962-971.

## МОНИТОРИНГ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕМ СПОНДИЛИТЕ

Иванов Д.В.

Научный руководитель - д.м.н., профессор Соколова Л.А.  
Кафедра внутренних болезней №2 УГМА

Анкилозирующий спондилит (АС) является тяжелым воспалительным заболеванием опорно-двигательного аппарата. В патогенезе болезни основную роль играют воспалительные процессы и новообразование костной ткани, проявляющееся формированием синдесмофитов и анкилозированием позвоночника. Недавние исследования показали, что при АС воспаление не связано с остеопролиферацией, более того, провоспалительные цитокины индуцируют экспрессию ингибиторов остеобластогенеза, противодействуя развитию анкилоза [4].

Достижением последних лет явилось внедрение в клиническую практику инновационных лекарственных препаратов, селективно блокирующих важные факторы патогенеза воспалительной реакции, в частности, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6. Несмотря на то, что они позволили существенно улучшить качество жизни пациентов, в ряде случаев, эти препараты оказываются неэффективными. Однако не получено достоверных данных об их влиянии на прогрессирование анкилозирования осевого скелета [4].

Таким образом, разработка мониторинга системной воспалительной реакции при АС является важной задачей для контроля качества лечения и прогрессирования заболевания, решение которой позволит уточнить механизмы патогенеза заболевания и даст возможность разработки инновационных алгоритмов диагностики и методов терапии, основанных на непосредственной оценке патологического процесса [1, 2].

**Цель исследования** – характеристика показателей воспалительного ответа для разработки мониторинга хронического системного воспаления при АС.

### Материалы и методы исследования

Обследовано 39 больных (20 мужчин и 9 женщин) с анкилозирующим спондилитом, находившихся на лечении в ревматологических отделениях ЦГКБ№6 и ЦГКБ№40 в 2008 – 2009 годах. Средний возраст составил 39 $\pm$ 11 лет (от 17 до 72 лет). Диагноз ставился на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев. Активность заболевания оценивалась по индексу BASDAI. Выявлены следующие системные проявления: поражение ЦНС (2 пациентов), почек (7 пациентов), периферических нервов (17 пациентов), слизистых оболочек (16 пациентов), ногтей (6 пациентов), субфебрилитет (8 пациентов), анемия (17 пациентов), миалгии (9 пациентов), конституциональные проявления – слабость, чувство разбитости, снижение массы тела (9 пациентов). Активность по BASDAI составила 21,77 $\pm$ 12,87 (от 0 до 47,7). В контрольную группу вошли 25 человек, признанных по результатам медосмотра практически здоровыми. Средний возраст 34 $\pm$ 8,11 лет, мужчин 15, женщин – 10.